



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 104447745 B

(45) 授权公告日 2016. 03. 30

(21) 申请号 201410617453. 9

CN 103360488 A, 2013. 10. 23,

(22) 申请日 2014. 11. 06

CN 102253215 A, 2011. 11. 23,

(73) 专利权人 济南金域医学检验中心有限公司
地址 250101 山东省济南市高新技术开发区
环保科技园正丰路正丰大厦六楼

CN 102253215 A, 2011. 11. 23,

CN 103242446 A, 2013. 08. 14,

US 4302438 A, 1981. 11. 24,

(72) 发明人 梁耀铭 虞留明 燕启江 胡朝晖

审查员 冯伟

(51) Int. Cl.

C07D 473/08(2006. 01)

C07K 14/765(2006. 01)

C07K 14/795(2006. 01)

C07K 14/435(2006. 01)

G01N 33/53(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 103360488 A, 2013. 10. 23,

权利要求书2页 说明书13页

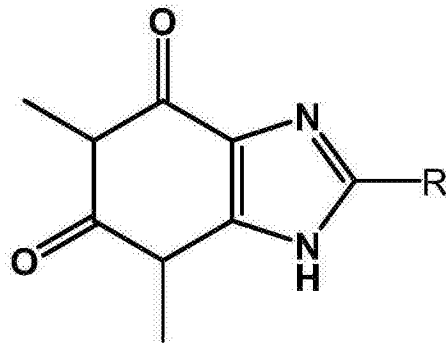
(54) 发明名称

一种茶碱均相酶免疫检测试剂盒及其制备方法

(57) 摘要

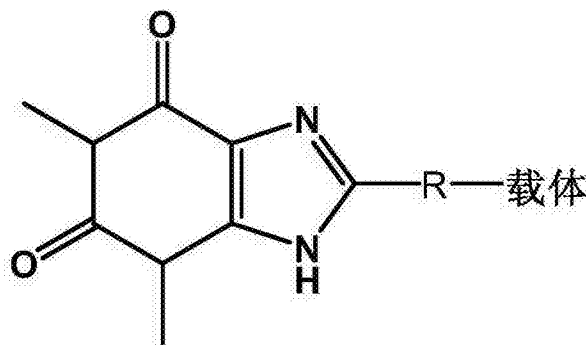
本发明的目的是提供一种简便、快速、灵敏度高和全自动化的茶碱药物浓度检测用的茶碱衍生物、茶碱人工抗原、均相酶试剂盒及其制备方法,为了解决上述技术问题,本发明提供一种茶碱均相酶免疫检测试剂盒及其制作方法,包括茶碱免疫原的合成,抗茶碱特异性抗体的制备,酶标偶联物的制备以及样本的测定。本发明灵敏度高,稳定性和重复性好。本发明在全自动生化分析仪上应用,操作简便,能进行高通量快速化的样品检测,适合常规治疗药物浓度的临床检测。该发明中提供的茶碱抗体的特异性强,药物交叉反应试验中,对测试的31种常见药物和化合物几乎无任何交叉反应,适合临床检验茶碱的血药浓度。

1. 一种茶碱衍生物,其可用于制备茶碱人工抗原,其结构式如下:



R 为 $-(\text{CH}_2)_6-\text{NH}-\text{COOH}$ 。

2. 一种用于均相酶检测的茶碱人工抗原,其通过权利要求 1 所述的茶碱衍生物与载体偶联而获得,其结构式如下:



式中,载体为血清蛋白,血蓝蛋白或甲状腺球蛋白。

3. 根据权利要求 2 所述的茶碱人工抗原,其特征在于,载体为牛血清蛋白

4. 一种茶碱均相酶免疫检测试剂盒,其特征在于,其由以下组分组成:

试剂 R1: 权利要求 1 所述的茶碱衍生物特异的多克隆抗体;

试剂 R2: 葡萄糖六磷酸脱氢酶标记的权利要求 1 所述茶碱衍生物;

试剂 R3: 定标液。

5. 一种制备权利要求 4 所述的茶碱均相酶免疫检测试剂盒的方法,其特征在于,具体步骤如下:

茶碱衍生物特异的单克隆或多克隆抗体的制备,葡萄糖六磷酸脱氢酶标记的茶碱衍生物的制备,定标液的制备。

6. 根据权利要求 5 所述的制备方法,其特征在于,所述茶碱衍生物特异的多克隆抗体的制备包括以下步骤:

步骤 a:

将牛血清白蛋白溶解于 0.2mol/L 的 pH 为 8.5 的磷酸缓冲液中;

茶碱衍生物的活化:将所述茶碱衍生物 100mg 置于容器中,并依次加入 2.5mL 二甲基酰胺、4.5mL 乙醇、7mL 磷酸钾缓冲液、400mg 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺和 50mg N-羟基琥珀酰亚胺;所述磷酸钾缓冲液浓度为 10mmol/L, pH 值为 5.5;

步骤 b:茶碱衍生物免疫抗原的偶联和纯化:将步骤 a 活化的茶碱衍生物滴加到步骤 a 所得的牛血清白蛋白溶液中,在 2~8°C 条件下搅拌 12-16 小时,将偶联的抗原进行孔径为

8KD 的透析袋透析纯化 ;从而制得茶碱人工抗原。

步骤 c :将步骤 b 合成的茶碱免疫抗原用 10mmol/L, pH7.4 的磷酸缓冲液稀释至 1.0mg/mL, 然后用茶碱免疫抗原溶液与弗氏完全佐剂混合, 对兔子进行注射, 14-21 天后, 再用相同的抗原溶液与弗氏不完全佐剂对兔子注射一次, 之后每隔 28 天注射一次, 从兔子进行初次注射开始, 经过 4 个月后获得的抗体。

7. 根据权利要求 6 所述的制备方法, 其特征在于, 所述葡萄糖六磷酸脱氢酶标记的茶碱衍生物的制备包括以下步骤 :

a、将 15mg 葡萄糖六磷酸脱氢酶溶解于 12mL Tris 缓冲液中, 然后依次加入 225mg 还原型辅酶 I、135mg 葡萄糖-6-磷酸、0.75mL 卡必醇和 2.25mL 二甲基亚砷 ;所述 Tris 缓冲液 pH 为 9.0, 各组分浓度为 :0.05mol/L Tris、3.3mmol/L 氯化镁, 145.4mmol/L 氯化钠 ;

b、茶碱衍生物的活化 :将特异的茶碱衍生物 8.64mg 溶解于 420 μ L 二甲基亚砷和 180 μ L 二甲基酰胺组成的混合溶液中, 所述混合溶液加入 6 μ L 三丁胺和 3 μ L 氯甲酸异丁酯, 在 2 ~ 8 $^{\circ}$ C 条件下搅拌 30 分钟 ;

c、将所述步骤 b 所得溶液逐滴加入到步骤 a 所得溶液中, 在 2 ~ 8 $^{\circ}$ C 条件下用磁力搅拌器搅拌 60 分钟, 将所得酶标抗原进行透析纯化, 得到葡萄糖六磷酸脱氢酶标记的茶碱衍生物。

一种茶碱均相酶免疫检测试剂盒及其制备方法

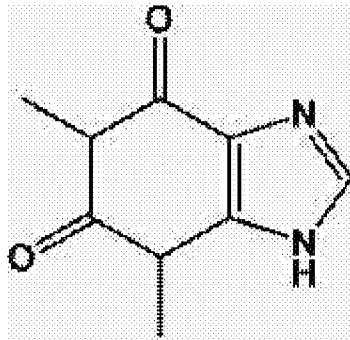
技术领域

[0001] 本发明属于医学检验领域,具体涉及一种茶碱均相酶免疫检测试剂盒及其制备方法。

背景技术

[0002] 茶碱为甲基黄嘌呤类的衍生物,临床上常用于治疗支气管哮喘、哮喘型慢性支气管炎和心源性哮喘等。但茶碱也具有很多毒副作用,包括:恶心,头痛,腹泻,呕吐,肠胃出血,癫痫以及心律失常等。由于茶碱的有效浓度治疗窗窄(治疗血清浓度参考范围为10-20 $\mu\text{g}/\text{mL}$),且毒副反应发生率与其血药浓度密切相关,因此在治疗期间对病人的茶碱血清浓度水平进行检测非常重要,茶碱的具体结构式如下:

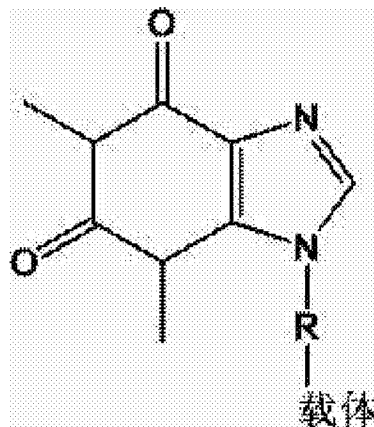
[0003]



[0004] 目前测定茶碱血药浓度的方法主要有高效液相色谱法(HPLC)和荧光偏振免疫分析法(FPIA)。高度自动化的FPIA法因其简便快速成为临床茶碱血药浓度监测最常用的方法,但其试剂盒依赖进口,价格昂贵和有效期较短是其不可回避的缺点。而HPLC法常因操作繁琐,效率低,测定周期长及分析成本高的缺点限制了其在临床药物浓度监测中的广泛应用。

[0005] EP0077896公开了一种抗茶碱特异性抗体和茶碱均相酶免疫检测试剂,其获得抗体的免疫原结构式如下:

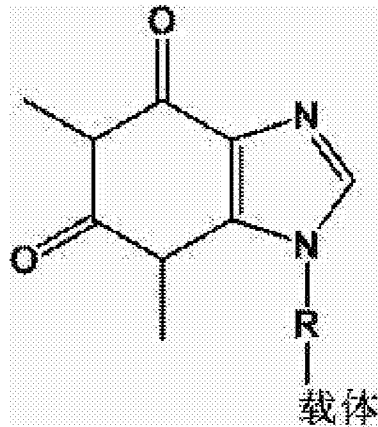
[0006]



[0007] CN201210258850公开了一种抗茶碱特异性抗体和茶碱均相酶免疫检测试剂,其获

得抗体的免疫原结构式如下：

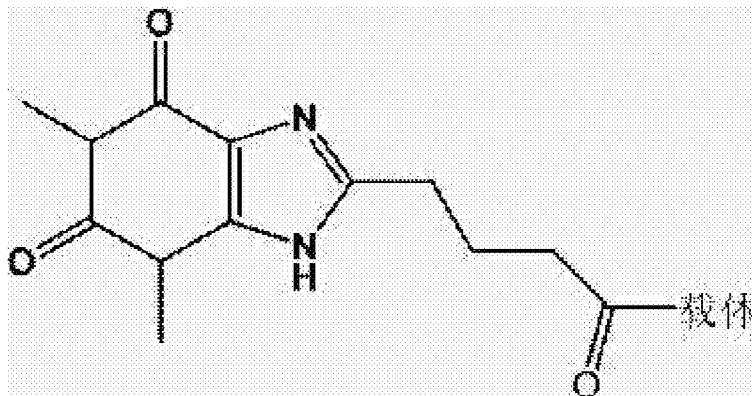
[0008]



[0009] 而 EP0077896 和 CN201210258850 的区别在于 R 取代基略有不同。

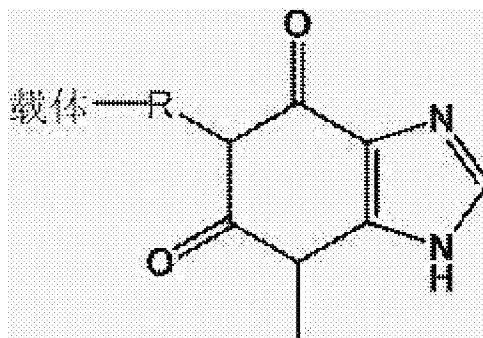
[0010] CN201310285736 也公开一种茶碱人工抗原,其也可应用于茶碱均相酶免疫检测试剂中,其公开的人工抗原结构式如下：

[0011]



[0012] US4230805 也公开一种茶碱人工抗原,其也可应用于茶碱均相酶免疫检测试剂中,其公开的人工抗原结构式如下：

[0013]

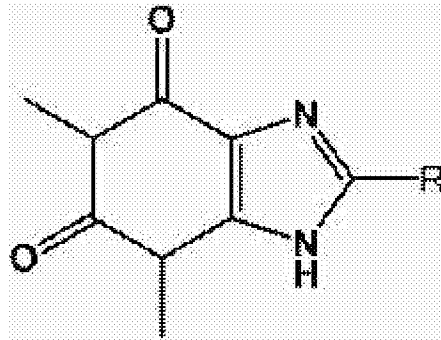


[0014] 众所周知,在茶碱均相酶检测中,采用的茶碱免疫原结构会直接决定其免疫原性,从而影响试剂盒的灵敏度和特异性。而上述现有技术公开的茶碱免疫原均不能体现茶碱的整体免疫性,从而导致试剂盒的灵敏度和特异性不佳。

发明内容

[0015] 本发明的一个目的是提供一种茶碱衍生物,其可用于制备茶碱人工抗原,其结构式如下:

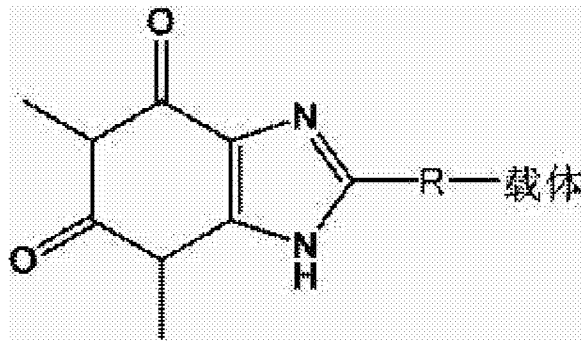
[0016]



[0017] R选自如下基团: $-\text{CO}-(\text{CH}_2)_n-\text{COOH}$ 、 $-\text{O}-(\text{CH}_2)_n-\text{COOH}$ 、 $-\text{CS}-(\text{CH}_2)_n-\text{COOH}$ 或 $-(\text{CH}_2)_n-\text{NH}-\text{COOH}$ 等, n是1至20之间的整数;R优选为 $-(\text{CH}_2)_6-\text{NH}-\text{COOH}$ 。

[0018] 在进一步地实施方案中,本发明还提供一种用于均相酶检测的茶碱人工抗原,其通过所述茶碱衍生物与载体偶联而获得,其结构式如下:

[0019]



[0020] 式中,载体为具有免疫原性的蛋白质。

[0021] 在本发明更进一步地实施方案中,载体优选为血清蛋白,血蓝蛋白或甲状腺球蛋白;更优选为牛血清蛋白。

[0022] 本发明的另一个目的是提供一种简便、快速、灵敏度高和全自动化的茶碱药物浓度检测试剂盒和制备方法。

[0023] 所述茶碱均相酶免疫检测试剂盒,包括以下组分:

[0024] 试剂 R1 :所述茶碱衍生物特异的多克隆抗体;

[0025] 试剂 R2 :葡萄糖六磷酸脱氢酶标记的茶碱衍生物;

[0026] 试剂 R3 :定标液;

[0027] 所述定标液为茶碱校准品溶于空白血清中制得;

[0028] 所述葡萄糖六磷酸脱氢酶标记的茶碱衍生物为所述茶碱衍生物与葡萄糖六磷酸脱氢酶偶联产物,所述葡萄糖六磷酸脱氢酶标记的茶碱衍生物能与茶碱衍生物特异抗体特异性结合;

[0029] 所述茶碱衍生物特异的多克隆抗体是以所述茶碱衍生物与牛血清白蛋白偶联的产物为人工抗原制得。

[0030] 优选的,所述定标液为6种不同茶碱质量浓度的溶液,所述定标液茶碱质量浓度分别为 $0 \mu\text{g/mL}$ 、 $2.5 \mu\text{g/mL}$ 、 $5.0 \mu\text{g/mL}$ 、 $10.0 \mu\text{g/mL}$ 、 $20.0 \mu\text{g/mL}$ 、 $40.0 \mu\text{g/mL}$ 。

[0031] 优选的,所述葡萄糖六磷酸脱氢酶标记的茶碱衍生物稀释度为 1:1000-1:6000,茶碱衍生物特异的多克隆抗体稀释度为 1:400-1:3000。

[0032] 为了解决上述技术问题,本发明所采用的另一个技术方案是提供一种茶碱均相酶免疫检测试剂盒的制作方法,所述方法包括以下步骤:茶碱衍生物特异的单克隆或多克隆抗体的制备,葡萄糖六磷酸脱氢酶标记的茶碱衍生物的制备,定标液的制备。

[0033] 优选的,所述茶碱衍生物特异的多克隆抗体的制备包括以下步骤:

[0034] 步骤 a:

[0035] 将牛血清白蛋白溶解于 0.2mol/L 的 pH 为 8.5 的磷酸缓冲液中;

[0036] 茶碱衍生物的活化:将所述茶碱衍生物 100mg 置于容器中,并依次加入 2.5mL 二甲基酰胺、4.5mL 乙醇、7mL 磷酸钾缓冲液、400mg 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺和 50mg N-羟基琥珀酰亚胺;所述磷酸钾缓冲液浓度为 10mmol/L, pH 值为 5.5;

[0037] 步骤 b:茶碱衍生物免疫抗原的偶联和纯化:将步骤 a 活化的茶碱衍生物滴加到步骤 a 所得的牛血清白蛋白溶液中,在 2~8℃ 条件下搅拌 12-16 小时,将偶联的抗原进行孔径为 8KD 的透析袋透析纯化;从而制得茶碱人工抗原。

[0038] 步骤 c:采用步骤 b 得到的茶碱衍生物免疫抗原制备茶碱衍生物抗体。

[0039] 优选的,所述步骤 c 为:

[0040] 将步骤 b 合成的茶碱免疫抗原用 10mmol/L, pH7.4 的磷酸缓冲液稀释至 1.0mg/mL,然后用茶碱免疫抗原溶液与弗氏完全佐剂混合,对兔子进行注射,14-21 天后,再用相同的抗原溶液与弗氏不完全佐剂对兔子注射一次,之后每隔 28 天注射一次,从兔子进行初次注射开始,经过 4 个月后获得的抗体。

[0041] 优选的,所述葡萄糖六磷酸脱氢酶标记的茶碱衍生物的制备包括以下步骤:

[0042] a、将 15mg 葡萄糖六磷酸脱氢酶溶解于 12mL Tris 缓冲液中,然后依次加入 225mg 还原型辅酶 I、135mg 葡萄糖-6-磷酸、0.75mL 卡必醇和 2.25mL 二甲基亚砷;所述 Tris 缓冲液 pH 为 9.0,各组分浓度为:0.05mol/L Tris、3.3mmol/L 氯化镁,145.4mmol/L 氯化钠;

[0043] b、茶碱衍生物的活化:将特异的茶碱衍生物 8.64mg 溶解于 420 μL 二甲基亚砷和 180 μL 二甲基酰胺组成的混合溶液中,所述混合溶液加入 6 μL 三丁胺和 3 μL 氯甲酸异丁酯,在 2~8℃ 条件下搅拌 30 分钟;

[0044] c、将所述步骤 b 所得溶液逐滴加入到步骤 a 所得溶液中,在 2~8℃ 条件下用磁力搅拌器搅拌 60 分钟,将所得酶标抗原进行透析纯化,得到葡萄糖六磷酸脱氢酶标记的茶碱衍生物。

[0045] 本发明的有益效果为本发明的茶碱药物浓度均相酶免疫检验试剂盒灵敏度高,稳定性和重复性好。

[0046] 1、本发明特异性强,如咖啡因,与茶碱的结果非常相似,本发明对测试的 31 种常见药物和化合物几乎无任何交叉反应,适合临床检验茶碱的血药浓度。

[0047] 2、本发明灵敏度能达到 0.01 μg/mL,远低于茶碱的临床用药范围 10-20 μg/mL。

[0048] 3、本发明在全自动生化分析仪上应用,操作简便,只需将样品加入到检测试剂中,通过 OD340nm 吸光值的变化即可计算出样品的含量,能够在全自动生化分析仪上实现临床样本的高通量、快速化检测;同时,检测试剂国产化能解决国内临床药物浓度检测试剂依赖进口、成本昂贵的问题,适合常规治疗药物浓度的临床检测。

具体实施方式

[0049] 为详细说明本发明的技术内容、构造特征、所实现目的及效果,以下结合实施方式详予说明。

[0050] 本发明的均相酶免疫检测试剂 R1 中含有抗茶碱的特异性抗体,加入含有茶碱的液体样本后,再加入含有葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6PDH)标记茶碱衍生物的 R2 试剂,组成均相酶免疫反应体系。反应体系中,抗体与酶标记的茶碱衍生物结合可导致酶的失活,而样本中的茶碱能竞争性的取代与抗体结合的酶标茶碱衍生物,并使其从抗体的结合位点上释放出来,从而使酶恢复活性。活性的 G6PDH 酶可将试剂中的氧化型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD⁺) 转化为还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH),NADH 在 340nm 有吸收峰,可通过测定吸光值的改变来测定茶碱的浓度。因此,反应液中的标记酶活性与样本中茶碱浓度相关,液体样本中茶碱的含量越多,游离的 G6PDH 酶标茶碱生物就越多,从而能得到更强的信号。

[0051] 本发明的内容包括茶碱免疫原的合成,抗茶碱特异性抗体的制备,酶标偶联物的制备以及样本的测定。分别通过化学合成的方法制备出 G6PDH-茶碱偶联物和 BSA-茶碱免疫原,并由此免疫原免疫动物,制备出特异性的抗茶碱多克隆抗体。将制备好的抗体和酶标偶联物配制成均相酶免疫试剂 R1 和 R2,在全自动生化分析仪上进行茶碱样本的测定。

[0052] 本发明的核心技术为均相酶免疫检测方法,其中试剂和待测样品均为液相,测定过程中不存在分离步骤,样品与抗体反应后再加入标记的抗原进行反应。

[0053] 实施例 1 茶碱衍生物的合成

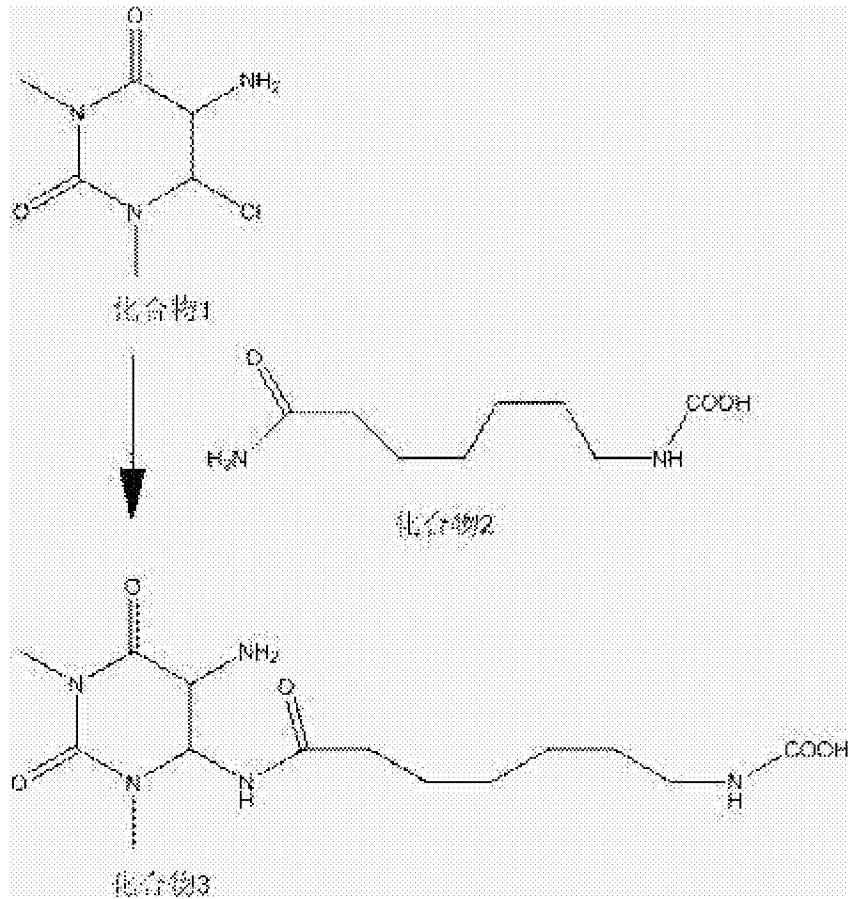
[0054] 步骤 1:先用 150 mL 无水乙醇溶解 100mmol 化合物 1 和 120 mmol 化合物 2,再加入 150mmol 三乙基铝得到第一反应溶液,将第一反应溶液加热回流反应 16 小时,冷却后将产物抽真空浓缩、重结晶得到产率为 33% 的化合物 3。

[0055] 化合物 3:

[0056] ESI-MS :344.08[M-H]

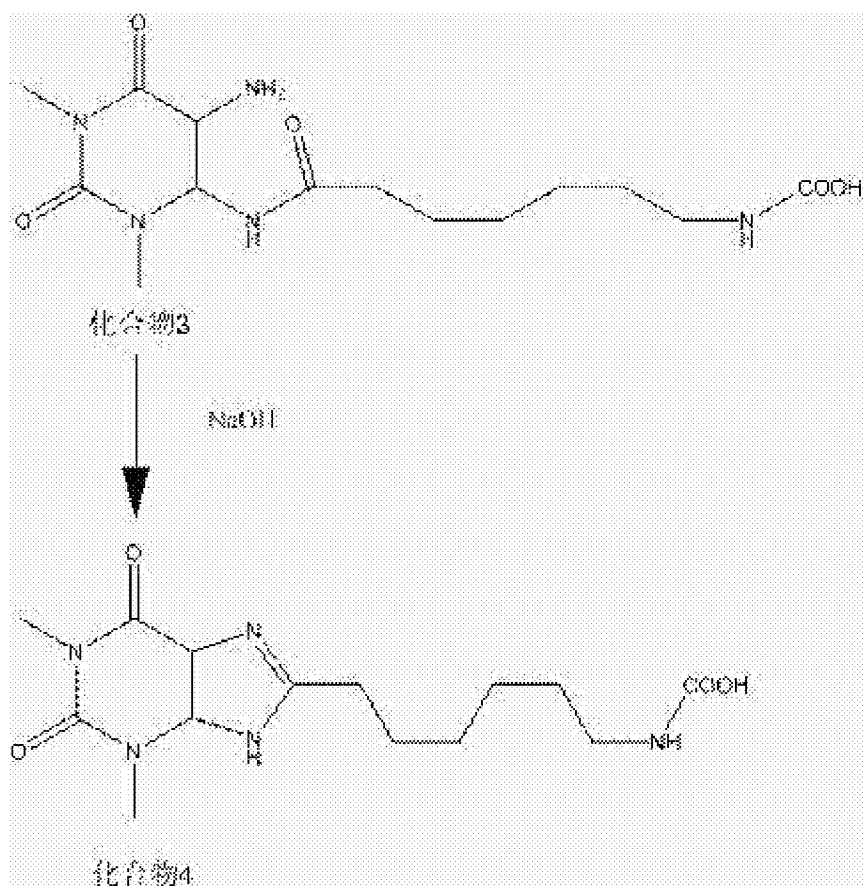
[0057] 元素分析:理论值/实测值,C(48.85/48.97),H(7.41/7.34),N(20.29/20.40),O(23.45/23.30)。

[0058]



[0059] 步骤2:向上一部产物中加入 15ml 的 2N 的 NaOH 溶液,75°C 油浴中回流反应 1.5 小时,反应结束后,冷却,用 6N 盐酸调 PH=3, 出现大量沉淀,过滤回收固体。然后经热水重结晶得到 17mg 化合物 4 (茶碱衍生物)。

[0060]



[0061] 利用 Bruker Avance III plus 300 MHz 对化合物 4 进行核磁共振光谱扫描, 采用 TMS 作为内标。结果如下: $^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6 , 300MHz): 12.09 (s, 1H), 6.76 (s, 1H), 6.48 (s, 1H), 5.14 (s, 1H), 3.18 (t, 2H), 3.02-3.06 (m, 6H), 2.98 (s, 1H), 2.25 (t, 2H, $J = 7.2$ Hz), 1.47-1.52 (m, 4H), 1.28-1.32 (m, 4H)。

[0062] ESI-MS :324.17 [M-H]

[0063] 元素分析: 理论值 / 实测值, C(51.61/51.68), H(7.21/7.13), N(21.47/21.52), O(19.71/19.67)。

[0064] 实施例 2

[0065] 1. 茶碱人工抗原的合成

[0066] a、将牛血清白蛋白(BSA) 250mg 溶解于 100mL 0.1mol/L, pH8.5 的磷酸缓冲液中;

[0067] b、将如下组分加入到烧杯中搅拌溶解: 100mg 实施例 1 制备的茶碱衍生物、2.5mL 二甲基酰胺(DMF)、4.5mL 乙醇、7.0mL (10mmol/L, pH5.0) 磷酸钾缓冲液、200mg 1-乙基-3-(3-二甲氨基) 碳二亚胺、50mg N-羟基琥珀酰亚胺(Sulfo-NHS), 搅拌溶解反应 30min; pH5.5;

[0068] 将上述 b 中溶解好的溶液滴加至上述 a 中的 BSA 溶液中, 并在 2-8°C 下搅拌过夜, 得到抗原;

[0069] 将合成好的抗原经过透析进行纯化, 得到茶碱人工抗原。

[0070] 2. 抗茶碱特异性抗体的制备

[0071] 用 PBS 磷酸缓冲液将合成的茶碱人工抗原稀释至 1.0mg/mL, 然后用 1.0mL 的抗原溶液与弗氏完全佐剂混合, 对家兔进行注射;

[0072] 14-21 天后, 再用 1.0mL 相同的抗原溶液与弗氏不完全佐剂对家兔注射一次, 之后

每隔四周一次,经过 4 个月后,获得的抗体效价约为 1 :320000。

[0073] 3. 葡萄糖 -6- 磷酸脱氢酶(G6PDH) 标记实施例 1 茶碱衍生物的制备

[0074] 1) G6PDH 酶溶液制备 :将 15mgG6PDH (100ku) 溶解于 12 mL Tris 缓冲液(0.05M Tris, 3.3mmol/L MgCl₂, 145.4mmol/LNaCl, pH 9.0)中。然后依次加入 225mgNADH、135mg 葡萄糖 -6- 磷酸(G6P) 及 0.75mL 卡必醇。接着逐滴加入 2.25mL 二甲亚砜(DMSO)。

[0075] 2) 茶碱衍生物的活化 :将 8.64 mg 茶碱衍生物溶解于 420 μ L DMSO 与 180 μ L DMF 的混合溶液中。然后将溶液冷却至 2 ~ 8 $^{\circ}$ C 后,加入 6 μ L 三丁胺和 3 μ L 氯甲酸异丁酯,在 2 ~ 8 $^{\circ}$ C 下搅拌 30 min。

[0076] 3) G6PDH 与茶碱衍生物的偶联 :将步骤 2) 中的溶液逐滴加入至步骤 1) 制备的溶液中,在 2 ~ 8 $^{\circ}$ C 下搅拌 60 分钟,得到偶联物。

[0077] 4) 将偶联物经过透析进行纯化,得到葡萄糖 -6- 磷酸脱氢酶酶标记的茶碱衍生物。

[0078] 4. 均相酶免疫试剂的制备

[0079] 1) R1 试剂的制备

[0080] 在 1LTris 缓冲液(55mmol/LTris,0.1%BSA,145.4mmol/LNaCl,3mmol/LMgCl₂, pH8.0)中依次加入 2.02gNAD 和 0.86gG6P,在室温下搅拌 10min。然后将抗体制备中得到的抗体加入溶液中,稀释比例为 1 :1000-1:6000。

[0081] 2) R2 试剂的制备

[0082] 在 1LTris 缓冲液(120mmol/LTris,0.1%BSA,145.4 mmol/LNaCl,3 mmol/L MgCl₂, pH8.2) 中加入 G6PDH 酶标记茶碱衍生物,稀释比例为 1:400-1:3000。

[0083] 可调节抗体和酶标偶联物在缓冲液中的浓度,以便优化测定工作曲线范围。

[0084] 实施例 3 利用全自动生化分析仪进行样本测试

[0085] (1). 血清标本的收集,按照常规方法收集血清标本;

[0086] (2). 根据日立 7180 型全自动生化仪的操作说明,打开仪器,进行仪器光密度检测和探针的清洗,检测仪器是否运行正常;

[0087] (3). 仪器检测运行正常后,将试剂 R1、R2 依次放入 R1、R2 试剂仓,血清标本放入样品盘 1(S1),0 μ g/mL、2.5 μ g/mL、5.0 μ g/mL、10.0 μ g/mL、20.0 μ g/mL、40.0 μ g/mL 的茶碱定标液放入样品盘 2(S2) 的指定位置;

[0088] (4). 仪器在 Stand by 状态时,设定茶碱的操作程序和检验参数,具体检验参数如表一:

[0089] 表一 血清中茶碱药物浓度检测参数

[0090]

| | |
|-----------|-----------------|
| 检测方法 | 两点速率法 |
| 样本量 | 10-35 μ L |
| T1 | 0 分钟 |
| T2 | 1.5 分钟 |
| 试剂 R1 | 100-200 μ L |
| 试剂 R2 | 100-200 μ L |
| 测光点 | 7 至 12 点 |
| 检测波长(主/副) | 340/405 |
| 定标类型 | Logit-Log(4P) |
| 定标液 1 | 0 μ g/mL |
| 定标液 2 | 2.5 μ g/mL |
| 定标液 3 | 5.0 μ g/mL |
| 定标液 4 | 10.0 μ g/mL |
| 定标液 5 | 20.0 μ g/mL |
| 定标液 6 | 40.0 μ g/mL |

[0091] (5) 按照设定的检验参数，首先进行定标实验，建立茶碱的定标曲线，然后根据建立的定标曲线，检测血清标本中茶碱的浓度。

[0092] (6) 检测血清标本中茶碱的浓度，仪器将测得的吸光度变化率根据标准曲线换算成药物浓度，并由终端显示打印检测报告。

[0093] 实施例 4

[0094] 1. 茶碱均相酶免疫定标曲线制作

[0095] 采用全自动生化分析仪进行茶碱的均相酶免疫检验，通过调整试剂 R1 和试剂 R2 的比例，可进一步优化反应体系，定标液茶碱质量浓度分别为 0 μ g/mL、2.5 μ g/mL、5.0 μ g/mL、10.0 μ g/mL、20.0 μ g/mL、40.0 μ g/mL。定标液的工作体积为 10-35 μ L，然后加入 100-200 μ L 试剂 R1 和 100-200 μ L 试剂 R2，采用两点速率法，检测主波长为 340nm、副波长为 405nm 的吸光度变化率，建立并优化茶碱均相酶免疫定标曲线，定标曲线的建立和优化在日立 7180 型全自动生化分析仪上完成。得到工作标准曲线，该曲线在 2.5-40.0 μ g/mL 范围内，线性良好，R=0.99。

[0096] 2. 灵敏度试验

[0097] 在空白血清中加入不等量的茶碱标准品，使其浓度分别为 0.0 μ g/mL、0.01 μ g/mL、0.02 μ g/mL 和 0.04 μ g/mL，用茶碱均相酶免疫检测试剂连续 5 次测定各个样品浓度，计算平均值和标准差。结果显示，0.01 μ g/mL 样品的测试结果在 3 倍标准差范围内(置信度 99.73%)与 0.0 μ g/mL 和 0.02 μ g/mL 的样品均无交叉。

[0098] 表二 灵敏度试验结果

[0099]

| 测试 (n=5) | 0.0 μg/mL | 0.01 μg/mL | 0.02 μg/mL | 0.04 μg/mL |
|--------------|----------------|------------------|------------------|-----------------|
| 平均值 | 0.00 | 0.024 | 0.046 | 0.93 |
| 标准差 (SD) | 0.00 | 0.002 | 0.004 | 0.009 |
| 平均值 ± 3SD | 0.00 ± 0.00 | 0.024 ± 0.006 | 0.046 ± 0.012 | 0.93 ± 0.027 |

[0100] 表二结果表明本发明中的茶碱均相酶免疫检测试剂的灵敏度可达到 0.01μg/mL。

[0101] 3. 药物干扰试验

[0102] 选取 31 种常用化合物和药物,调整其浓度为 10 μg/mL,进行干扰试验测定,试验结果如表三所示:

[0103] 表三 药物干扰试验结果

[0104]

| ID# | 化合物名称 | 等价于茶碱的浓度(μg/mL) |
|-----|---------|-----------------|
| 1 | 乙酰水杨酸 | 0.00 |
| 2 | 苯巴比妥 | 0.00 |
| 3 | 异戊巴比妥 | 0.00 |
| 4 | 氟尿嘧啶 | 0.00 |
| 5 | 苯乙胺 | 0.00 |
| 6 | 咖啡因 | 0.27 |
| 7 | 甲氧二氧苯 | 0.00 |
| 8 | 羧丙嗪 | 0.00 |
| 9 | 羧氨苯 | 0.00 |
| 10 | d-甲基苯丙胺 | 0.00 |
| 11 | 非诺洛芬 | 0.00 |
| 12 | 吉非贝齐 | 0.00 |
| 13 | 龙胆酸 | 0.00 |
| 14 | 二氢可待因 | 0.01 |
| 15 | 布洛芬 | 0.00 |
| 16 | 丙咪嗪 | 0.00 |
| 17 | (L)-麻黄素 | 0.00 |
| 18 | 利多卡因 | 0.00 |

[0105] 结果表明该发明中提供的茶碱抗体的特异性强, 药物交叉反应试验中, 对测试的 31 种常见药物和化合物几乎无任何交叉反应, 适合临床检验茶碱的血药浓度。

[0106] 4. 精密度试验

[0107] 在空白血清中加入茶碱标准品, 制备浓度分别为 2.5 (低), 10.0 (中), 40.0 (高) $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的血清样品, 每种样品用茶碱均相酶免疫检测试剂重复测定 5 次, 连续测定 5 天, 分别计算 3 种浓度批内、批间精密度。

[0108] 表四精密度试验结果

[0109]

| 茶碱浓度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) | 批内变异系数%(intra-CV%) | 批间变异系数%(inter-CV%) |
|-------------------------------------|--------------------|--------------------|
| 2.5 | 1.03 | 1.74 |
| 10.0 | 1.26 | 0.79 |
| 40.0 | 0.89 | 1.07 |

[0110] 5. 回收率试验

[0111] 在空白血清中加入茶碱标准品, 使其浓度分别为 2.5, 5.0, 10.0, 20.0 和 40.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 用茶碱均相酶免疫检测试剂连续 5 次测定各个样品浓度, 计算回收率。

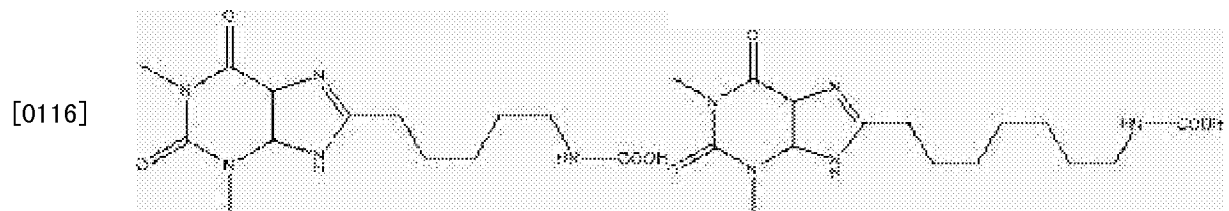
[0112] 表五回收率试验结果

[0113]

| 测试(n=5) | 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ | 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ | 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ | 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ | 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ |
|-----------|-----------------------------|---------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| 平均值 | 2.54 | 5.11 | 10.21 | 20.21 | 40.72 |
| 回收率 | 101.6 | 102.2 | 102.1 | 101.05 | 101.8 |
| 标准差 | 0.03 | 0.04 | 0.07 | 0.11 | 0.61 |
| 变异系数(CV%) | 1.09 | 0.97 | 0.85 | 0.57 | 1.13 |

[0114] 对比试验 1

[0115] 为了说明本发明的茶碱均相酶检测试剂盒的优越性, 采用不同但结构与本发明结构类似的茶碱衍生物, 按照实施例 1 和 2 所述的方法制备相应的人工抗原、多克隆抗体及均相酶试剂盒, 并对所制备的均相酶试剂盒进行实施例 4 所列出的实验, 各对比比例采用的茶碱衍生物结构如下:



[0117] 对比例 1

对比例 2

[0118] 对比例 3: 来自专利文献 CN201310285736 的说明书实施例 1 的步骤 1 中所合成的茶碱衍生物,

[0119] 对比例 4: 来自专利文献 CN201210258850 的说明书第 025 段的化合物结构式 II。

[0120] 具体结果如下:

[0121] (1) 灵敏度试验

[0122] 按照实施例 4 的测试方法, 对各对比比例制备的茶碱均相酶试剂盒进行了测试, 各

对比比例的灵敏度结果如下：

[0123]

| | | | | |
|----------------------|-------|-------|-------|-------|
| N=5 | 对比例 1 | 对比例 2 | 对比例 3 | 对比例 4 |
| 灵敏度 $\mu\text{g/mL}$ | 0.1 | 0.08 | 0.4 | 0.2 |

[0124] (2) 药物干扰试验

[0125]

| 等价于茶碱的浓度 ($\mu\text{g} / \text{mL}$) | 药物浓度 ($10\mu\text{g} / \text{mL}$) | | | |
|--|--------------------------------------|-------|-------|-------|
| | 对比例 1 | 对比例 2 | 对比例 3 | 对比例 4 |
| 二氢可待因酮 | 0.12 | 0.09 | 0.34 | 0.27 |
| 咖啡因 | 0.79 | 0.84 | 1.54 | 1.39 |

[0126] (3) 精密度试验

[0127]

| 茶碱 ($10\mu\text{g} / \text{mL}$) | 对比例 1 | 对比例 2 | 对比例 3 | 对比例 4 |
|------------------------------------|-------|-------|-------|-------|
| Intra-CV% | 2.19 | 2.87 | 4.23 | 3.16 |
| Inter-CV% | 1.45 | 1.74 | 2.67 | 1.89 |

[0128] 对比试验 2

[0129] 将对比试验 1 中的对比例 1-4 制备的茶碱衍生物在与 BSA 偶联时,测定各对比比例的偶联比,另外在此对比试验中,本发明还添加了对比例 5 和 6,对比例 5 和 6 采用的茶碱衍生物为实施例 1 制备的茶碱衍生物,但在制备方法的一些参数上与实施例 2 的步骤 1 略有不同,具体如下：

[0130]

| | 对比例 5 | 对比例 6 |
|----------------|-----------|-----------|
| BSA 用量 | 200mg | 300mg |
| BSA 溶解用磷酸缓冲液浓度 | 0.05mol/L | 0.2 mol/L |
| DMF 用量 | 2.0ml | 3.0ml |

[0131] 除上表参数外,对比例 5 和 6 其他制备方法同实施例 2

[0132] 偶联比的测定方法:参见专利文献 201310285736 的说明书第 07-09 段,具体结果如下：

[0133]

| | 实施例 1 | 对比例 1 | 对比例 2 | 对比例 3 | 对比例 4 | 对比例 5 | 对比例 6 |
|------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| 偶联比 (%) | 39 | 28 | 24 | 17 | 22 | 31 | 39 |

[0134] 以上所述仅为本发明的实施例,并非因此限制本发明的专利范围,凡是利用本发明说明书所作的等效结构或等效流程变换,或直接或间接运用在其他相关的技术领域,均同理包括在本发明的专利保护范围内。

| | | | |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译) | 一种茶碱均相酶免疫检测试剂盒及其制备方法 | | |
| 公开(公告)号 | CN104447745B | 公开(公告)日 | 2016-03-30 |
| 申请号 | CN201410617453.9 | 申请日 | 2014-11-06 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 济南金域医学检验中心有限公司 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 济南金域医学检验中心有限公司 | | |
| 当前申请(专利权)人(译) | 济南金域医学检验中心有限公司 | | |
| [标]发明人 | 梁耀铭 虞留明 燕启江 胡朝晖 | | |
| 发明人 | 梁耀铭 虞留明 燕启江 胡朝晖 | | |
| IPC分类号 | C07D473/08 C07K14/765 C07K14/795 C07K14/435 G01N33/53 G01N33/531 | | |
| CPC分类号 | C07D473/08 C07K14/47 C07K14/765 C07K14/795 G01N33/53 G01N33/531 | | |
| 审查员(译) | 冯伟 | | |
| 其他公开文献 | CN104447745A | | |
| 外部链接 | Espacenet SIPO | | |

摘要(译)

本发明的目的是提供一种简便、快速、灵敏度高和全自动化的茶碱药物浓度检测用的茶碱衍生物、茶碱人工抗原、均相酶试剂盒及其制备方法，为了解决上述技术问题，本发明提供一种茶碱均相酶免疫检测试剂盒及其制作方法，包括茶碱免疫原的合成，抗茶碱特异性抗体的制备，酶标偶联物的制备以及样本的测定。本发明灵敏度高，稳定性和重复性好。本发明在全自动生化分析仪上应用，操作简便，能进行高通量快速化的样品检测，适合常规治疗药物浓度的临床检测。该发明中提供的茶碱抗体的特异性强，药物交叉反应试验中，对测试的31种常见药物和化合物几乎无任何交叉反应，适合临床检验茶碱的血药浓度。

| 检测方法 | 两点速率法 |
|-----------|-----------------|
| 样本量 | 10-35 μ L |
| T1 | 0 分钟 |
| T2 | 1.5 分钟 |
| 试剂 R1 | 100-200 μ L |
| 试剂 R2 | 100-200 μ L |
| 测光点 | 7 至 12 点 |
| 检测波长(主/副) | 340/405 |
| 定标类型 | Logit-Log(4P) |
| 定标液 1 | 0 μ g/mL |
| 定标液 2 | 2.5 μ g/mL |
| 定标液 3 | 5.0 μ g/mL |
| 定标液 4 | 10.0 μ g/mL |
| 定标液 5 | 20.0 μ g/mL |
| 定标液 6 | 40.0 μ g/mL |